

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008 年度～2009 年度
 課題番号：20890012
 研究課題名（和文） 強定常磁場による造血幹細胞の分化・増殖促進作用及びその機構解明
 研究課題名（英文） The functional analysis of exposure to a MRI-type high-strength static magnetic field stimulates megakaryocytic/erythroid hematopoiesis in CD34+ cells from human placental and umbilical cord blood.

研究代表者

門前 暁 (MONZEN SATORU)
 弘前大学・大学院保健学研究科・助手
 研究者番号：20514136

研究成果の概要（和文）：

ヒト臍帯血由来造血幹・前駆細胞である CD34⁺細胞に対する 5 テスラまたは 10 テスラという強定常磁場の長時間曝露は、細胞の生死には影響を与えなかったが、10 テスラで 16 時間曝露により、巨核球・赤血球前駆細胞由来コロニー数は有意に増加した。このとき初期造血関連及び細胞周期関連遺伝子が sham コントロールに比べ有意な発現増加を示した。本研究よりヒト造血幹・前駆細胞に対する強定常磁場曝露が、巨核球・赤血球造血への分化を特異的に亢進することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The biological response after exposure to a high-strength static magnetic field (SMF) has recently been widely discussed from the perspective of possible health benefits as well as potential adverse effects. To clarify this issue, CD34⁺ cells from human placental and umbilical cord blood were exposed under conditions of high-strength SMF in vitro. The high-strength SMF exposure system was comprised of a magnetic field generator with a helium-free superconducting magnet with built-in CO₂ incubator. Freshly prepared CD34 cells were exposed to a 5 tesla (T) SMF with the strongest magnetic field gradient (41.7 T/m) or a 10 T SMF without magnetic field gradient for 4 or 16 h. In the harvested cells after exposure to 10 T SMF for 16 h, a significant increase of hematopoietic progenitors in the total burst-forming unit erythroid- and megakaryocytic progenitor cells-derived colony formation was observed, thus producing 1.72- and 1.77-fold higher than the control, respectively. Furthermore, early hematopoiesis-related and cell cycle-related genes were found to be significantly up-regulated by exposure to SMF. These results suggest that the 10 T SMF exposure may change gene expressions and result in the specific enhancement of megakaryocytic/erythroid progenitor (MEP) differentiation from pluripotent hematopoietic stem cells and/or the proliferation of bipotent MEP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：造血幹・前駆細胞、巨核球前駆細胞、赤血球前駆細胞、定常磁場、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

我々の生活空間にあふれる電磁場の種類と量は急激に増加している。医療分野では核磁気共鳴装置 (magnetic resonance imaging: MRI) に代表される画像診断分野において定常磁場の利用が進んでいる。近年、取得画像の高解像度化を目的とした MRI の強磁場化が国際的な流れとなっているが、一方でそれに伴う強定常磁場に曝された際の生体への影響についての詳細については、不明な点が多い。とりわけ酸化ストレス高感受性な細胞である造血幹細胞の分化・増殖過程における強定常磁場の影響についての報告はほとんどないことから、定常磁場が生体組織に対して刺激応答因子となるか明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、生活空間あるいは MRI 画像診断領域において、生体内造血組織が強定常磁場に曝されたことを想定し、ヒト臍帯血由来造血幹・前駆細胞を用いて、強定常磁場に対する影響を血液学及び分子生物学レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題を遂行するために使用するヒト造血幹細胞は、協力病院において医師から提供者及びその家族に対し、臍帯血採取に関するインフォームドコンセントを行い、分娩後安全に採取可能な場合に限った臍帯血から分離・精製した。これら実験の全ては弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の管理下において実施した。本研究は以下の3点が重要な課題となる。

- (1) 造血幹・前駆細胞の定常磁場応答分子ならびに応答遺伝子の探索
- (2) 造血幹・前駆細胞の定常磁場曝露における感受性の解明
- (3) 細胞特異的応答であるかの解明

これらの課題を解決するために、①定常磁場曝露 CD34⁺細胞における骨髓系造血前駆細胞のバイアビリティ、②定常磁場曝露 CD34⁺細胞における mRNA 発現の変化、③定常磁場曝露 CD34⁺細胞から産生されるサイトカインの種類と量について Bio-Plex 装置(Bio-Rad)を利用して解析した。

4. 研究成果

- (1) ヒト CD34⁺造血前駆細胞のコロニー形成に与える定常磁場曝露の影響

CD34⁺細胞に5テスラ(T)及び10 T の定常磁場を曝露した場合、細胞の生死に有意な変動は見られなかった(data not shown)。細胞を10 T で16時間曝露した場合、巨核球前駆細胞 (CFU-Meg) 及び赤血球前駆細胞 (BFU-E) 由来コロニー形成は有意に増加し、sham コ

ントロールに比べそれぞれ1.72倍、1.77倍となった (Fig.1)。このとき、赤血球前駆細胞由来コロニーの形態が、sham コントロールに比して小型化することが観察された (Fig.2)。一方、白血球前駆細胞 (CFU-GM) 及びより未熟な前駆細胞である混合系前駆細胞 (CFU-Mix) には、定常磁場曝露によるコロニー形成に変化は見られなかった。また、5-T 曝露及び10-T で4時間曝露した条件下においても変化は見られなかった。

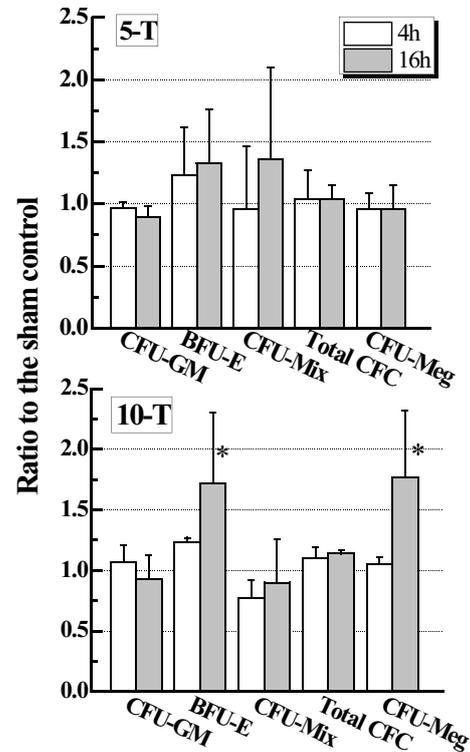


Fig.1. Effects of exposure to SMF on colony forming cells. Human CB CD34⁺ cells were exposed to a 5-T or 10-T high-strength SMF exposure in 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After the exposure for 4 hrs or 16 hrs, the cells were harvested, assayed for hematopoietic progenitor cells in semi-solid culture with cytokines and incubated for 11-14 days. The values are the mean ± S.D. of more than three separate experiments in three wells. **P* < 0.05.

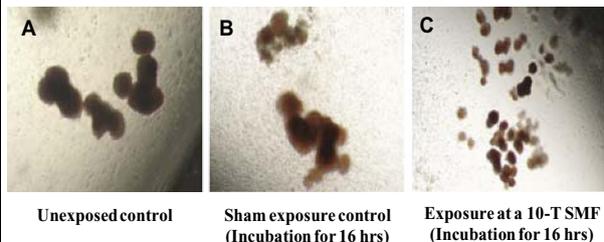


Fig.2. BFU-E developed from CB CD34⁺ cells after the exposure to each SMF. To evaluate the effects of the strong SMF on HPCs, human CB

CD34⁺ cells were assayed by methylcellulose colony formation. The typical morphologies of BFU-E were shown in unexposed control (A) or sham control (B), and in exposed to 10-T SMF (C).

(2) 強定常磁場曝露ヒト CD34⁺細胞における mRNA 発現の変化

10 T で 16 時間曝露した CD34⁺細胞では、巨核球・赤血球系分化が特異的に亢進したことから、この現象と遺伝子発現に関連があるかを明らかにするため、cDNA マイクロアレイ解析を実施した。その結果、Gene Ontology 解析において、Biological process 分類では "Signal transduction", "Transcription" 群などに (Table 1)、Molecular function 分類では "Nucleotide binding", "Receptor activity" などに (Table 2)、Cellular component では "nucleus", "membrane" などに有意な発現変動をする遺伝子が多くみられた (Table 3)。これらの結果から、造血系転写因子群及び細胞周期関連群に SMF が影響を及ぼしていることが推測されることから、これら遺伝子の再現性実験をリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。その結果、早期造血関連遺伝子である KIT、GATA2、RUNX1、TEL や細胞周期関連遺伝子である CDC25B、ERN1 発現が sham コントロールに比べ有意に増加した (Fig.3)。

Table 1. Biological process

	Upward Regulation	Decline regulation	Total gene
Signal transduction	53	79	324
Transcription	67	50	294
Biological process unknown	22	40	152
Ion transport	11	27	94
Cell-cell signaling	18	17	90
Cell cycle	14	18	74
Cell differentiation	13	16	72
Electron transport	14	13	68

Table 2. Molecular function

	Upward regulation	Decline regulation	Total gene
Nucleotide binding	65	84	364
Receptor activity	45	79	316
Transcription factor activity	46	56	233
Calcium ion binding	22	64	225
Molecular function unknown	30	35	164
Nucleic acid binding	28	19	127
Protein serine/threonine kinase activity	18	25	117
RNA binding	15	17	83

Table 3. Cellular component

	Upward regulation	Decline regulation	Total gene
nucleus	170	153	792
membrane	84	137	537
integral to plasma membrane	51	81	329
Cytoplasm	53	43	240
Plasma membrane	22	41	151
Cellular component unknown	28	32	151
Extracellular space	19	27	151
membrane fraction	22	34	134

Note: To detect the differentially expressed genes during each exposure to a strong SMF of CD34⁺ cells, the extracted total RNAs were analyzed using a cDNA microarray (Illumina system). The data in the table showed significant changes in the gene expression from CD34⁺ cells exposed to SMF at a 10-T for 4 and 16 hrs in comparison to the sham control (5248 genes). We classified them based on the classification of Gene Ontology.

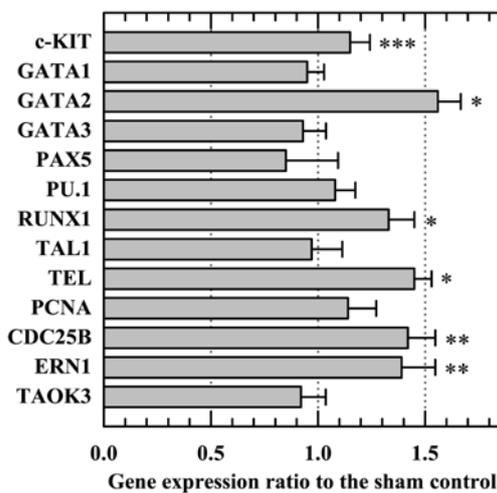


Fig. 3. Gene expression of hematopoietic stem cells after exposure to high-strength SMF. Total RNA were extracted from CB CD34⁺ cells after exposure to a 10-T for 16 hrs. The quantification of gene expression was analyzed by real-time RT-PCR method. Gene expression was calculated using a "Gene Expression Analysis for iCycler iQ Real-time PCR Description System". The values are the mean \pm S.D. of four separate experiments. * P < 0.001, ** P < 0.01, *** P < 0.05.

(3) ヒト CD34⁺細胞のサイトカイン産生に対する強定常磁場の影響

遺伝子発現解析の結果を受け、強定常磁場曝露 CD34⁺細胞における特異的な分化応答は、細胞がサイトカインを自己産生して応答するオートクラインまたはパラクラインが関

与していることが予測されるため、定常磁場曝露条件において、造血幹・前駆細胞から産生されるサイトカインを培養上清から回収してその濃度を解析した。その結果、10 T の定常磁場を曝露した条件下において、主に骨髓造血を制御するサイトカインである PDGFbb、IL-1ra、IL-8、MCP-1 及び MCP-1 は、sham コントロールに比べそれぞれ 2.81 倍、1.99 倍、1.90 倍、1.80 倍及び 1.68 倍に増加した (Table 4)。一方、IFN- γ 及び GM-CSF は sham コントロールに比べそれぞれ 0.76 倍及び 0.42 倍に減少した。

Table 4. The analysis of cytokine production

Cytokines	Sham control (pg/ml)	10-T exposure (pg/ml)	Fold increase (10-T/sham)
PDGFbb	4.54	12.76	2.81
IL-1ra	24.38	48.57	1.99
IL-8	803.46	1530.15	1.90
MIP-1a	34.54	62.24	1.80
MCP-1	8.95	15.05	1.68
IFN- γ	10.48	8.02	0.76
GM-CSF	35.45	15.04	0.42

(4) 結論

本研究課題遂行の結果、ヒト造血幹・前駆細胞に対する 10-T という強定常磁場の長時間曝露は、造血幹・前駆細胞における造血関連遺伝子の発現を変動させた結果 (Fig. 4)、赤血球・巨核球系分化を特異的に亢進することが明らかとなった。

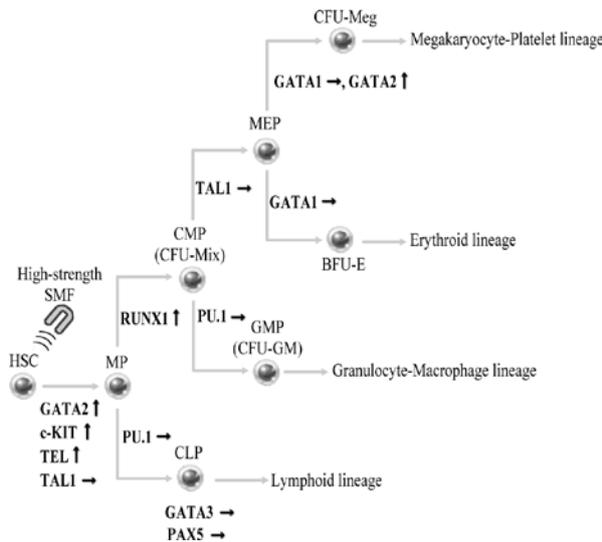


Fig. 4. A functional distribution of analyzed genes and its changing by static magnetic exposure in Hematopoietic differentiation. The upper arrows bar “ \uparrow ” means significant up regulation in comparison to the sham control, and the right arrows bar “ \rightarrow ” means no significant

changing. CLP: common lymphoid progenitors; CMP: common myeloid progenitors; GMP: granulocyte macrophage progenitors.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) K. Kato, K. Takahashi, S. Monzen, H. Yamamoto, A. Maruyama, K. Itoh and I. Kashiwakura. Relationship between radiosensitivity and Nrf2 target gene expression in human hematopoietic stem cells. *Radiat. Res.*, in press. (査読有)
- 2) H. Yoshino, K. Takahashi, S. Monzen and I. Kashiwakura. Effects of proteoglycan extracted from nasal cartilage of salmon heads on maturation of dendritic cells derived from human peripheral blood monocytes. *Biol Pharm Bull.*, 33, 311-315 (2010). (査読有)
- 3) K. Takahashi, S. Monzen, N. Hayashi and I. Kashiwakura. Correlations of cell surface antigens with individual differences in radiosensitivity in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Radiat Res.*, 173, 184-190 (2010). (査読有)
- 4) S. Monzen, K. Osuda, Y. Miyazaki, N. Hayashi, K. Takahashi and I. Kashiwakura. Radiation sensitivities in the terminal stages of megakaryocytic maturation and platelet production. *Radiat Res.*, 172, 314-320 (2009). (査読有)
- 5) S. Monzen, K. Takahashi, H. Yoshino, K. Kasai-Eguchi, Y. Abe, A. Maruyama, Ken Itoh and I. Kashiwakura. Heavy ion beam irradiation regulates the mRNA expression in megakaryocytopoiesis from human hematopoietic stem/progenitor cells. *J Radiat Res (Tokyo)*, 50, 477-486 (2009). (査読有)
- 6) S. Monzen, K. Takahashi, T. Toki, E. Ito, T. Sakurai, J. Miyakoshi and I. Kashiwakura. Exposure to a MRI-type high-strength static magnetic field stimulates megakaryocytic/erythroid hematopoiesis in CD34⁺ cells from human placental and umbilical cord blood. *Bioelectromagnetics.*, 30, 280-285 (2009). (査読有)
- 7) R. Terasawa, Y. Fukushi, S. Monzen, T. Miura, K. Takahashi, A. Yoshizawa and I. Kashiwakura. The promoting activity on human megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by liquid crystal-related compounds. *Biol Pharm Bull.*, 32, 976-981 (2009). (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 金行 由樹子, 門前 暁, 高橋 賢次, 柏倉 幾郎. ヒト造血前駆細胞の放射線感受性に及ぼすミトコンドリアの関与. **日本放射線影響学会第 52 回大会**, 講演要旨集 P2-80, 広島, 2009 年 11 月 11-13 日.
- 2) 加藤 健吾, 高橋 賢次, 門前 暁, 丸山 敦史, 伊藤 健, 柏倉 幾郎. ヒト造血幹細胞の放射線感受性における酸化ストレス応答機構の関与. **日本放射線影響学会第 52 回大会**, 講演要旨集 P2-87, 広島, 2009 年 11 月 11-13 日.
- 3) S. Monzen, K. Osuda, Y. Miyazaki, N. Hayashi, K. Takahashi and I. Kashiwakura. Radiation sensitivities in the terminal stages of megakaryocytic maturation and platelet production. *ISEH 37th Annual Scientific Meeting, Exp. Hematol.*, 37, S69-S70, Athens, Greece, September 9-12, 2009.
- 4) S. Monzen, N. Hayashi, K. Takahashi and I. Kashiwakura. Correlations of cell surface antigens with the individual differences of radio-sensitivity in human hematopoietic stem/progenitor cells. *The 1st International Symposium on Radiation Emergency Medicine in Hirosaki University*, proceedings p11, Hirosaki, Japan, August 1, 2009.
- 5) 門前 暁, 高橋 賢次, 吉野 浩教, 笠井-江口 清美, 阿部 由直, 柏倉 幾郎. 重粒子線照射ヒト造血幹・前駆細胞の巨核球分化初期における遺伝子変化. **第 47 回日本医学放射線学会生物部会学術大会**, 講演要旨集 P6, 富山市, 2009 年 7 月 10 日.
- 6) 加藤 健吾, 高橋 賢次, 門前 暁, 丸山 敦史, 伊東 健, 柏倉 幾郎. ヒト末梢造血前駆細胞の放射線感受性における Nrf2 の応答. **日本放射線影響学会第 51 回大会**, 講演要旨集 P105, 北九州市, 2008 年 11 月 19-21 日.
- 7) 門前 暁, 高橋 賢次, 土岐 力, 伊藤 悦朗, 櫻井 智徳, 宮越 順二, 柏倉 幾郎. ヒト CD34 陽性細胞の分化および遺伝子発現に強定常磁場が及ぼす作用. **第 3 回日本磁気科学会**, Poster presentation No.10, 弘前市, 2008 年 10 月 1-2 日.
- 8) 林 直樹, 門前 暁, 吉野 浩教, 高橋 賢次, 中村 敏也, 阿部 由直, 柏倉 幾郎. 放射線曝露ヒト造血幹細胞の造血回復に及ぼす臍帯血由来間葉系幹細胞様ストローマ細胞の関与. **第 2 回東北精鑽研究会**, 講演要旨集 P21, 弘前市, 2008 年 9 月 26 日.
- 9) K. Takahashi, I. Kashiwakura, S. Monzen, H. Yoshino, Y. Abe, K and Eguchi-Kasai.

Effects of LET-radiation on human megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis. *ISEH 37th Annual Scientific Meeting, Exp. Hematol.*, 36, 82, Boston, USA, July 9-12, 2008.

- 10) R. Terasawa, Y. Fukushi, S. Monzen, K. Takahashi, A. Yoshizawa and I. Kashiwakura. The promoting activity on human megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by liquid crystal-related compounds. *The 22nd International Liquid Crystal Conference*, poster presentation No. 830, Jeju, Korea, Jun 29 - July 4, 2008.
- 11) 門前 暁, 高橋 賢次, 土岐 力, 伊藤 悦朗, 櫻井 智徳, 宮越 順二, 柏倉 幾郎. ヒト CD34 陽性細胞の分化および遺伝子発現に強定常磁場が及ぼす作用. **第 47 回日本医学放射線学会生物部会学術大会**, 講演要旨集 P61, 高知市, 2008 年 6 月 21 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

個人ホームページ

http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/kouhou/hokengaku/cms/index.cgi/kenkyu/r_housha/73

6. 研究組織

(1)研究代表者

門前 暁 (MONZEN SATORU)

弘前大学・大学院保健学研究科・助手

研究者番号：20514136

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし